

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11046772 A**

(43) Date of publication of application: **23.02.99**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
A01K 67/027
C12Q 1/00

(21) Application number: **09220235**

(22) Date of filing: **31.07.97**

(71) Applicant: **YAMAMOTO MASAYUKI**
YAMANOUCHI PHARMACEUT
CO LTD

(72) Inventor: **YAMAMOTO MASAYUKI**
NABESHIMA YOICHI
ITO TAKESHI

(54) **NEW SCREENING AND CREATION OF NEW
NONHUMAN ANIMAL**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a means for screening a substance capable of affecting the binding of a heterodimer comprising an Nrf2 protein and a small Maf protein to an antioxidant response element(ARE).

SOLUTION: A substance doubtful about the exertion of an influence on the binding of a heterodimer to an antioxidant response element is exposed to an individual, a cell, a tissue or an organ (except a human individual) in which the expression regulatory mechanism of a phase II enzyme in a xenobiotic-metabolizing system by binding

the heterodimer to the antioxidant response element is normal and a change in the expression level of the phase II enzyme in the xenobiotic-metabolizing system and the transcription level of an mRNA of the phase II enzyme in the xenobiotic-metabolizing system is analyzed.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-46772

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月23日

(51) Int.Cl.⁸

C 1 2 N 15/09

A 0 1 K 67/027

C 1 2 Q 1/00

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 15/00

A 0 1 K 67/027

C 1 2 Q 1/00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数7 F D (全 18 頁)

(21) 出願番号

特願平9-220235

(22) 出願日

平成9年(1997) 7月31日

(71) 出願人 597116610

山本 雅之

茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大
学基礎医学系分子発生生物学教室内

(71) 出願人 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(72) 発明者 山本 雅之

茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大
学基礎医学系分子発生生物学教室内

(74) 代理人 弁理士 森田 憲一 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規スクリーニング方法及び新規非ヒト動物の作出方法

(57) 【要約】

【課題】 N r f 2タンパク質と小M a fタンパク質と
からなるヘテロ2量体と、抗酸化剤反応配列(A R E)
との結合に影響を与える物質をスクリーニングする手段
を提供する。

【解決手段】 前記ヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列に
結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機
構が正常である動物の個体、細胞、組織、又は器官(但
し、ヒト個体を除く)に、ヘテロ2量体と抗酸化剤反応
配列との結合に影響を与える疑いのある物質を暴露さ
せ、異物代謝系第2相酵素の発現量又は異物代謝系第2
相酵素のm R N Aの転写量の変化を分析する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Nrf2タンパク質と小Mafタンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である動物の個体、細胞、組織、又は器官（但し、ヒト個体を除く）に、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列との結合に影響を与える疑いのある物質を暴露させ、異物代謝系第2相酵素の発現量又は異物代謝系第2相酵素のmRNAの転写量の変化を分析することを特徴とする、異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法。

【請求項2】 抗酸化剤反応配列の制御領域にレポータータンパク質をコードする構造遺伝子を発現可能に結合させた組換えDNAを有し、Nrf2タンパク質と小Mafタンパク質とからなるヘテロ2量体の生産が可能な形質転換体に、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列との結合に影響を与える疑いのある物質を暴露させ、前記の組換えDNAに結合させたレポータータンパク質の発現量又は前記のレポータータンパク質のmRNAの転写量の変化を分析することを特徴とする、異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法。

【請求項3】 nrf2遺伝子を破壊したノックアウト非ヒト動物、又はその動物の細胞、組織、若しくは器官に、生体に悪影響を与える疑いのある物質を暴露させ、生体に悪影響を与える疑いのある前記物質を暴露していないnrf2遺伝子を破壊したノックアウト非ヒト動物、又はその細胞、組織、若しくは器官との差異を分析することを特徴とする、生体に悪影響を与える物質のスクリーニング方法。

【請求項4】 生体に悪影響を与える物質が、発癌性物質、催奇形性物質、慢性毒性物質、亜急性毒性物質、又は急性毒性物質である請求項3に記載の方法。

【請求項5】 nrf2遺伝子を破壊したノックアウト非ヒト動物、又はその細胞、組織、若しくは器官に、生体に悪影響を与える物質と、その物質の作用を変化させる可能性のある物質とを暴露させ、生体に悪影響を与える物質のみに暴露したnrf2遺伝子を破壊したノックアウト非ヒト動物、又はその細胞、組織、若しくは器官との差異を分析することを特徴とする、生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質のスクリーニング方法。

【請求項6】 生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質が、抗発癌性物質、抗催奇形性物質、又は抗毒性物質である請求項5に記載の方法。

【請求項7】 Nrf2タンパク質と小Mafタンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である非ヒト動物に、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列との結合に影響を与える物質を暴露することを特徴とする、異物代謝系が変化した非ヒト動物の作出方

法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、異物代謝系に影響を与える物質、生体に悪影響を与える物質、及び生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質のスクリーニング方法、並びに、異物代謝系が変化した非ヒト動物の作出方法に関する。

【0002】

10 【従来の技術】人類が特に産業革命以来創出し続けている膨大な化学物質群の中に、発癌性や催奇形性を有するものが多数存在していることは確実であり、今後も、そのような新しい化学物質群が更に環境中に蓄積されていくことになることも確実である。従って、それらの化学物質が生物に及ぼす影響を一層正確に評価するシステムの開発が求められている。化学物質の発癌性や催奇形性を理解するためには、生体における異物代謝系の検討が重要である。

【0003】環境に存在する異物に生体が暴露されると、生体内で解毒酵素群が誘導される（文献1：後記の参考文献欄参照）。これらの酵素は、生体異物を、水溶性のより高い誘導体へと変換する。こうした異物代謝系は、第1相反応と、その後引き続いて起きる第2相反応とからなる。第1相反応は、チトクロームP-450モノオキシゲナーゼ系による反応であり、化学的に不活性な化合物から、強い癌原性を有する中間体が生成される（文献2）。続く、第2相反応は、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）やNAD（P）H：キノン酸化還元酵素（NQO1）などの酵素による反応であり、前記の中間体を、一般的に毒性のより低い誘導体へと変換する。例えば、図1に示すように、発癌性物質であるベンゾ[a]ピレンやアフラトキシン（aflatoxin）B1は、第1相反応により、それぞれ酸化されてオキシ化中間体に変換する。これらのオキシ化中間体は、第2相反応により、それぞれ還元されてヒドロキシ体に変換され、この形で体外に排泄される。ところが、第1相反応が進行した後に、第2相反応の進行が阻害されると、第1相反応によって生成した前記のオキシ化中間体が、生体内に蓄積する。このオキシ化中間体は、DNA障害性を与える物質（DNAアダクト）とな

20 30 40 50

って、変異の原因となる。なお、図1において、「GS」はグルタチオンを意味する。

【0004】前記の異物代謝系第1相に属する遺伝子群は、異物反応性配列（Xenobiotics Responsive Element；XRE）と、そのXREに結合するPAS群転写因子によって調節されていることが知られている（文献3）。一方、前記の第2相酵素群の誘導が、抗酸化剤反応配列（Antioxidant Response Element；ARE）の転写制御下にあるものと想像されてはいたが、それを

分子レベル及び個体レベルで実験的に証明した報告は、従来、全くなかった。勿論、前記の抗酸化剤反応配列 (ARE) に作用する転写因子の実体は不明であり、従って、その転写制御の機構は全く解明されていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、*nrf2* 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作出し、異物代謝系第2相に属する遺伝子群の発現解析を実施したところ、*Nrf2* タンパク質と小*Ma f* タンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列 (ARE) に結合することにより、第2相酵素遺伝子の転写が制御されていることを見出した。本発明は、こうした知見に基づくものである。

【0006】従って、本発明の課題は、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列 (ARE) との結合が第2相酵素遺伝子の転写を制御していることを利用して、その結合に影響を与える物質をスクリーニングする手段を提供することにある。また、本発明の別の課題は、*nrf2* 遺伝子を破壊したノックアウト動物又はその動物由来の細胞などを利用して、生体に悪影響を与える物質をスクリーニングする手段を提供することにある。更にまた、本発明の別の課題は、ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列 (ARE) との結合に影響を与える物質を用いて、異物代謝系が変化した非ヒトモデル動物を作出する手段を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】前記課題は、本発明による、*Nrf2* タンパク質と小*Ma f* タンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である動物の個体、細胞、組織、又は器官（但し、ヒト個体を除く）に、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列との結合に影響を与える疑いのある物質を暴露させ、異物代謝系第2相酵素の発現量又は異物代謝系第2相酵素のmRNAの転写量の変化を分析することの特徴とする、異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法により解決することができる。

【0008】また、前記課題は、本発明による、*nrf2* 遺伝子を破壊したノックアウト非ヒト動物（以下、*nrf2* ノックアウト非ヒト動物と称することがある）、又はその動物の細胞、組織、若しくは器官に、生体に悪影響を与える疑いのある物質を暴露させ、生体に悪影響を与える疑いのある前記物質を暴露していない*nrf2* 遺伝子を破壊したノックアウト非ヒト動物、又はその細胞、組織、若しくは器官との差異を分析することの特徴とする、生体に悪影響を与える物質のスクリーニング方法によっても解決することができる。

【0009】更に、前記課題は、本発明による、*Nrf2* タンパク質と小*Ma f* タンパク質とからなるヘテロ2

量体が抗酸化剤反応配列に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である非ヒト動物に、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列との結合に影響を与える物質を暴露することの特徴とする、異物代謝系が変化した非ヒト動物の作出方法によっても解決することができる。

【0010】

【発明の実施の形態】本明細書において、「*Nrf2* タンパク質」とは、小*Ma f* タンパク質と一緒にあって、抗酸化剤反応配列に結合することのできるヘテロ2量体を形成することのできるタンパク質を意味し、「*nrf2* 遺伝子」とは、前記*Nrf2* タンパク質をコードする遺伝子を意味する。

【0011】*nrf2* 遺伝子及び*Nrf2* タンパク質は、ヒト及びマウスにおいて見出されており、アミノ酸配列レベルで80.7%の相同性を有している。また、これらの*Nrf2* タンパク質と高い相同性を示すニワトリECHタンパク質（文献12）も見出されている。従って、他の動物にも、これらの遺伝子及びタンパク質に相当する遺伝子及びタンパク質が存在すると考えられる。本明細書においては、前記の用語「*nrf2* 遺伝子」には、ヒト及びマウス*nrf2* 遺伝子、ニワトリ*ech* 遺伝子、並びに種々の動物におけるヒト及びマウス*nrf2* 遺伝子に相当する遺伝子が含まれる。また、同様に、前記の用語「*Nrf2* タンパク質」には、ヒト及びマウス*Nrf2* タンパク質、ニワトリECHタンパク質、並びに種々の動物におけるヒト及びマウス*Nrf2* タンパク質に相当するタンパク質が含まれる。

【0012】本明細書において、「小*Ma f* タンパク質」とは、前記*Nrf2* タンパク質と一緒にあって、抗酸化剤反応配列に結合することのできるヘテロ2量体を形成することのできるタンパク質を意味し、「小*ma f* 遺伝子」とは、前記小*Ma f* タンパク質をコードする遺伝子を意味する。前記小*Ma f* タンパク質として、それぞれ別々の遺伝子にコードされ、構造的に類似する複数のタンパク質が知られている。例えば、ニワトリ及びマウスでは、*Ma f F* タンパク質、*Ma f G* タンパク質、及び*Ma f K* タンパク質が知られており、これらのタンパク質は、本明細書における小*Ma f* タンパク質に含まれる。

【0013】本明細書において、「異物代謝系」とは、暴露して生体に取り込まれた物質を水溶化により無毒化する系を意味し、「異物系代謝系第1相酵素」とは、チトクロームP450モノオキシゲナーゼ系により水酸化され、時に癌原性を有する中間体を生成する代謝関連酵素を意味し、「異物系代謝系第2相酵素」とは、前記第1相酵素により生成した代謝物の抱合反応等を行ない、それらの毒性の低い中間体への代謝に関連する一群の酵素を意味する。前記の異物系代謝系第2相酵素には、例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼ（以下、GS

10

20

30

40

50

Tと称することがある)、NAD(P)H:キノン酸化還元酵素(以下、NQO1と称することがある)、又はエポキシドヒドラーゼなどが含まれる。

【0014】本明細書において、「抗酸化剤反応配列(Antioxidant Response Element; 以下、AREと称することがある)」とは、抗酸化剤によって活性化を受ける遺伝子上の転写制御配列を意味する。

【0015】本発明による異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法においては、(1)Nr f 2タンパク質と小Ma fタンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列(ARE)に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である動物の

個体、細胞、組織、又は器官(但し、ヒト個体を除く)(以下、スクリーニング用正常体と称することがある)、あるいは、(2)抗酸化剤反応配列(ARE)の制御領域にレポータータンパク質をコードする構造遺伝子を発現可能に結合させた組換えDNAを有し、Nr f 2タンパク質と小Ma fタンパク質とからなるヘテロ2量体の生産が可能な形質転換体(以下、レポータータンパク質含有形質転換体と称することがある)に、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列(ARE)との結合に影響を与える疑いのある物質を暴露させ、所定のタンパク質の発現量又はそのmRNAの転写量の変化を分析することによって、異物代謝系に影響を与える物質、特に、異物代謝系第2相酵素の基礎的・誘導的発現に影響を与える物質(例えば、Nr f 2タンパク質のDNA結合活性を阻害し、第2相酵素の発現を阻害する物質、あるいは、Nr f 2タンパク質の核移行を促進し、AREを介した転写を促進する物質など)を選択することができる。

【0016】本発明による異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法に用いることのできるスクリーニング用正常体は、Nr f 2タンパク質と小Ma fタンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列(ARE)に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である動物の個体、細胞、組織、又は器官(但し、ヒト個体を除く)である限り、特に限定されるものではなく、例えば、非ヒト動物の個体、又はヒトを含む動物の細胞、組織、若しくは器官などを用いることができ、好ましくは、肝臓、小腸、若しくは腎臓、又は肝臓、小腸、若しくは腎臓由来の組織若しくは細胞(肝臓、小腸、若しくは腎臓から得た細胞を培養したもの、及びその細胞を不死化したものを含む)を用いることができる。

【0017】本明細書において、「Nr f 2タンパク質と小Ma fタンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列(ARE)に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である」とは、抗酸化剤などによる第2相酵素群の誘導が正常であることを意

味する。また、前記ヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列

(ARE)に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常であることは、例えば、AREを用いた電気泳動移動度シフトアッセイ、又は第2相酵素群に特異的に反応する抗体を用いたウエスタンブロッティング解析などの方法によって確認することができる。

【0018】なお、本明細書において、「動物」には、ヒト及び非ヒト動物が含まれるものとし、「非ヒト動物」とは、ヒトを除く動物を意味し、例えば、ヒトを除く哺乳動物(例えば、マウス、イヌ、ネコ、ラット、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、イルカ、又はウマなど)、鳥類(例えば、ニワトリ又はウズラなど)、両生類(例えば、カエルなど)、爬虫類、又は昆虫(例えば、ショウジョウバエなど)などを挙げることができる。

【0019】本発明による異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法に用いることのできるレポータータンパク質含有形質転換体は、抗酸化剤反応配列(ARE)の制御領域にレポータータンパク質をコードする構造遺伝子を発現可能に結合させた組換えDNAを有し、Nr f 2タンパク質と小Ma fタンパク質とからなるヘテロ2量体の生産が可能な形質転換体である限り、特に限定されるものではない。

【0020】前記レポータータンパク質としては、細胞内において遺伝子発現の指標として使用することのできる公知のレポータータンパク質を用いることができ、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 β -グルクロニダーゼ(GUS)、 β -D-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、又はエクオリンなどを挙げることができる。

【0021】前記レポータータンパク質含有形質転換体は、抗酸化剤反応配列(ARE)の制御領域にレポータータンパク質をコードする構造遺伝子を発現可能に結合させた組換えDNA(例えば、AREの下流に、レポータータンパク質をコードする構造遺伝子を配置した組換えDNAなど)を用いて、適当な宿主細胞を形質転換することにより調製することができる。

【0022】前記宿主細胞としては、例えば、動物細胞(例えば、哺乳動物細胞、鳥類細胞、両生類細胞、爬虫類細胞、又は昆虫細胞など)又は微生物などを使用することができる。前記宿主細胞が、Nr f 2タンパク質と小Ma fタンパク質とからなるヘテロ2量体を生産することができない細胞である場合、すなわち、nr f 2遺伝子及び/又は小ma f遺伝子を欠損している場合には、前記組換えDNAによる形質転換に加えて、欠損している遺伝子を含む組換えDNAによる形質転換を実施することによって、本発明に使用することのできる前記レポータータンパク質含有形質転換体を得ることができる。

【0023】本発明による異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法においては、被検試料〔すなわち、ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列(ARE)との結合に影響を与える疑いのある物質〕を、適当な被暴対象物(すなわち、スクリーニング用正常体又はレポータータンパク質含有形質転換体)に暴露させ、所定のタンパク質の発現量又はそのmRNAの転写量の変化を分析することによって、異物代謝系に影響を与える物質を選択することができる。

【0024】被検試料を暴露させる方法は、被暴対象物に応じて適宜決定することができる。被暴対象物として非ヒト動物個体を使用する場合には、例えば、皮膚への塗布、経口投与、吸入投与、又は注射(例えば、静脈内、皮下、又は器官内など)などの方法により、被検試料を被暴対象物に暴露させることができる。被暴対象物として非ヒト動物個体を使用し、内臓での代謝毒性を分析する場合には、経口投与することが好ましい。被暴対象物として細胞、組織、又は器官を使用する場合には、それらの被暴対象物を維持又は増殖するのに用いられる適当な溶液(例えば、培地、培養液、又は緩衝液など)に被検試料を添加することが一般的である。

【0025】本発明による異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法において、被暴対象物としてスクリーニング用正常体を使用する場合には、異物代謝系第2相酵素の発現量又は異物代謝系第2相酵素のmRNAの転写量の変化を分析することによって、異物代謝系に影響を与える物質を選択することができる。すなわち、被検試料が、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列(ARE)との結合を阻害する物質である場合には、異物代謝系第2相酵素の発現量又は異物代謝系第2相酵素のmRNAの転写量が減少する。逆に、被検試料が、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列(ARE)との結合を促進する物質である場合には、異物代謝系第2相酵素の発現量又は異物代謝系第2相酵素のmRNAの転写量が増大する。

【0026】異物代謝系第2相酵素の発現量は、公知のアッセイ方法、例えば、ウエスタンブロッティング法又は酵素活性測定法などにより測定することができ、被検試料を暴露させた場合の前記酵素の発現量と、被検試料を暴露していない場合の前記酵素の発現量とを比較することにより、異物代謝系第2相酵素の発現量の変化を分析することができる。

【0027】異物代謝系第2相酵素のmRNAの転写量は、公知のアッセイ方法、例えば、ノザンブロッティング法又はRNAseプロテクションアッセイ法などにより測定することができ、被検試料を暴露させた場合の前記酵素のmRNAの転写量と、被検試料を暴露していない場合の前記酵素のmRNAの転写量とを比較することにより、異物代謝系第2相酵素のmRNAの転写量の変化を分析することができる。

【0028】本発明による異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法において、被暴対象物としてレポータータンパク質含有形質転換体を使用する場合には、レポータータンパク質の発現量又はレポータータンパク質のmRNAの転写量の変化を分析することによって、異物代謝系に影響を与える物質を選択することができる。レポータータンパク質の発現量又はレポータータンパク質のmRNAの転写量の変化も、異物代謝系第2相酵素の発現量又は異物代謝系第2相酵素のmRNAの転写量の変化を分析する場合と同様にして、公知の方法により分析することができる。

【0029】本発明による前記スクリーニング方法により、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列(ARE)との結合を阻害することが判明した物質は、例えば、癌耐性予防剤、薬剤耐性防止剤、又は薬剤作用増強剤として有用であり、更には、異物代謝系が変化した非ヒト動物(このような動物は、後述するnrf2遺伝子ノックアウト非ヒト動物と同様に、生体に悪影響を与える物質のスクリーニングに利用することができる)を作出するのに利用することができる。逆に、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列(ARE)との結合を促進することが判明した物質は、例えば、解毒剤、発癌予防剤、又は生体の解毒・代謝を促進するための薬剤として有用である。

【0030】本発明による生体に悪影響を与える物質のスクリーニング方法においては、nrf2ノックアウト非ヒト動物(すなわち、nrf2遺伝子を破壊したノックアウト非ヒト動物)、又はその動物の細胞、組織、若しくは器官に、生体に悪影響を与える疑いのある物質を暴露させ、生体に悪影響を与える疑いのある前記物質を暴露していないnrf2ノックアウト非ヒト動物、又はその細胞、組織、若しくは器官との差異を分析することによって、生体に悪影響を与える物質を選択することができる。

【0031】本発明による生体に悪影響を与える物質のスクリーニング方法によって選択することのできる「生体に悪影響を与える物質」とは、投与の結果、生体(例えば、遺伝子など)に障害を及ぼす物質が生産されてくる物質を意味し、例えば、発癌性物質、催奇形性物質、慢性毒性物質、亜急性毒性物質、又は急性毒性物質などが含まれる。

【0032】本発明による生体に悪影響を与える物質のスクリーニング方法において用いることのできるnrf2ノックアウト非ヒト動物は、2つのnrf2遺伝子が両方とも破壊され、それにコードされるNrf2タンパク質の機能が欠損した非ヒト動物、すなわち、対立遺伝子の両方が破壊されているホモ接合体非ヒト動物であれば特に限定されるものではない。

【0033】前記nrf2ノックアウト非ヒト動物の内、nrf2ノックアウト非ヒト哺乳動物は、従来公知の方法(文献4)により作出することができる。例え

10

20

30

40

50

ば、相同性組換えにより少なくとも一方の対立遺伝子を破壊した胚性幹 (embryonic stem) 細胞 (以下、ES細胞と称する) を、受精卵の胚盤胞に注入するか、あるいは、桑実胚と会合させた後に、偽妊娠非ヒト哺乳動物に移植することにより、ES細胞由来の細胞と胚由来の細胞とが混じったキメラ非ヒト哺乳動物を得ることができる。得られたキメラ哺乳動物と相当する野生型哺乳動物とを交配すると、対立遺伝子の一方のみが破壊されているヘテロ接合体哺乳動物を作出することができる。更に、得られたヘテロ接合体哺乳動物同士を交配させることにより、対立遺伝子の両方が破壊されているホモ接合体哺乳動物を得ることができる。

【0034】前記ES細胞としては、例えば、マウスの場合には、E14 (文献15)、CCE、J1、又はTT2などを使用することができる。ES細胞の相同性組換えは、例えば、nr f 2ゲノムDNAの途中に、Nr f 2タンパク質の発現を妨げることのできる任意のDNA配列を挿入した組換えDNAを、ES細胞に導入することにより実施することができる。Nr f 2タンパク質の発現を妨げることのできる前記の挿入DNA配列は、特に限定されるものではないが、組換えDNAのES細胞への導入を確認することができる点で、薬剤耐性遺伝子 [例えば、ネオマイシン耐性 (neo) 遺伝子] などを用いることが好ましく、正常Nr f 2タンパク質の発現様式を知ることができる点で、レポーター遺伝子 [例えば、β-ガラクトシダーゼ (lacZ) 又は緑色蛍光タンパク質 (GFP)] などを用いることが好ましい。

【0035】前記DNAの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法又はマイクロインジェクション法などを挙げることができる。相同性組換えによりnr f 2遺伝子を破壊したES細胞は、常法に従って、例えば、サザンブローディング法により確認することができる。

【0036】相同性組換えによりnr f 2遺伝子を破壊したES細胞を有するキメラ非ヒト哺乳動物を作出する方法としては、例えば、胚盤胞マイクロインジェクション法、又は会合法などを挙げることができる。胚盤胞マイクロインジェクション法では、例えば、受精から約3.5日目の非ヒト哺乳動物の胚盤胞に、予めnr f 2遺伝子を破壊したES細胞をマイクロインジェクトし、処理した胚盤胞を偽妊娠非ヒト哺乳動物に移植することにより、所望のキメラ非ヒト哺乳動物を作出することができる。また、会合法では、受精から約2.5日目の非ヒト哺乳動物の桑実胚と、予めnr f 2遺伝子を破壊したES細胞とを会合させ、それを偽妊娠非ヒト哺乳動物に移植することにより、所望のキメラ非ヒト哺乳動物を作出することができる。

【0037】キメラ非ヒト動物と相当する野生型非ヒト動物とを交配することにより得られるヘテロ接合体非ヒト動物、あるいは、得られたヘテロ接合体非ヒト動物同

士を更に交配させることにより得られるホモ接合体非ヒト動物は、例えば、尾から採取したDNAを用いたサザンブローディング法により、nr f 2遺伝子が破壊されていることを確認することができる。このようにして得られたnr f 2ノックアウト非ヒト動物、あるいは、それを系代飼育することにより得られたnr f 2ノックアウト非ヒト動物のいずれをも、本発明による生体に悪影響を与える物質のスクリーニング方法に用いることができる。

- 10 【0038】本発明による生体に悪影響を与える物質のスクリーニング方法においては、被検試料 (すなわち、生体に悪影響を与える疑いのある物質) を、適当な被暴対象物 (すなわち、nr f 2ノックアウト非ヒト動物、又はその動物の細胞、組織、若しくは器官) に暴露させ、前記被検物質を暴露していない被暴対象物との差異を分析することによって、あらゆる物質 (例えば、環境中、又は飲食物若しくは食餌中に存在する物質) の中から、生体に悪影響を与える物質を選択することができる。本発明による生体に悪影響を与える物質のスクリー
- 20 ニング方法において用いることのできる器官、組織、又は細胞としては、肝臓、小腸、若しくは腎臓、又は肝臓、小腸、若しくは腎臓由来の組織若しくは細胞 (肝臓、小腸、若しくは腎臓から得た細胞を培養したもの、及びその細胞を不死化したものを含む) が好ましい。

- 【0039】被検試料を暴露させる方法は、使用する被暴対象物に応じて適宜決定することができる。被暴対象物として非ヒト動物個体を使用する場合には、例えば、皮膚への塗布、経口投与、吸入投与、又は注射 (例えば、静脈内、皮下、又は器官内など) などの方法により、被検試料を被暴対象物に暴露させることができる。
- 30 また、被暴対象物として非ヒト動物個体を使用し、内臓での代謝毒性を分析する場合には、経口投与することが好ましい。被暴対象物として細胞、組織、又は器官を使用する場合には、それらの被暴対象物を維持又は増殖するのに用いられる適当な溶液 (例えば、培地、培養液、又は緩衝液など) に被検試料を添加することが一般的である。

- 【0040】本発明による生体に悪影響を与える物質のスクリーニング方法に用いることのできる前記nr f 2ノックアウト非ヒト動物は、ホモ接合体であり、第2相酵素群の転写レベルでの誘導に必要なヘテロ2量体の構成成分の1つであるNr f 2タンパク質を発現することができないので、第2相酵素群が存在しない。或る生体異物が野生型非ヒト動物の個体内、又は細胞、組織、若しくは器官内に侵入すると、その生体異物は、第1相酵素群及び第2相酵素群により2段階、すなわち、往々にして癌原性の強い中間体を経て、水溶性で且つ毒性が低い生成物に変換され、体外へ放出される。しかし、nr f 2ノックアウト非ヒト動物では、或る生体異物がその
- 40 個体内、又は細胞、組織、若しくは器官内に侵入して
- 50

も、第2相酵素群が存在しないので、第1相酵素群の作用により変換された癌原性の強い中間体が個体内、又は細胞、組織、若しくは器官内に蓄積し、第2相酵素群による解毒が行なわれない。従って、nrf2ノックアウト非ヒト動物は、生体に悪影響を与える物質に対する閾値が大きく低下していることが期待され、鋭敏なスクリーニング系として利用することができる。

【0041】本発明による生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質のスクリーニング方法においては、適当な被暴対象物（すなわち、nrf2ノックアウト非ヒト動物、又はその細胞、組織、若しくは器官）に、生体に悪影響を与える物質（すなわち、生体に悪影響を与えることが判明している物質）と、その物質のその作用（すなわち、前記の悪影響）を変化させる可能性のある物質とを暴露させ、生体に悪影響を与える物質のみに暴露した被暴対象物との差異を分析することによって、生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質を選択することができる。

【0042】本発明による生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質のスクリーニング方法によって選択することのできる「生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質」とは、生体に悪影響を与える物質の作用を、増強、低下、又は消失させることのできる物質を意味する。「生体に悪影響を与える物質」と「生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質」との組合せとしては、例えば、発癌性物質と抗発癌性物質との組合せ、催奇形性物質と抗催奇形性物質との組合せ、又は毒性物質と抗毒性物質との組合せなどを挙げることができる。

【0043】本発明による生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質のスクリーニング方法は、生体に悪影響を与える疑いのある物質を単独で暴露させる代わりに、生体に悪影響を与える物質と、その物質のその作用を変化させる可能性のある物質とを同時に暴露させること以外は、本発明による生体に悪影響を与える物質のスクリーニング方法の場合と同様にして実施することができる。

【0044】本発明による異物代謝系が変化した非ヒト動物の作出方法によれば、Nrf2タンパク質と小Mafタンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列（ARE）に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である非ヒト動物に、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列（ARE）との結合に影響を与える物質を暴露することによって、異物代謝系が変化した非ヒト動物を作出することができる。

【0045】本発明による作出方法に用いることのできるヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列（ARE）との結合に影響を与える物質は、例えば、本発明による異物代謝系に影響を与える物質のスクリーニング方法により適宜選択することができる。ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配

列（ARE）との結合に影響を与える物質としては、例えば、フェノール性抗酸化剤として知られているブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）を挙げることができる。

【0046】このBHAは、種々の発癌物質（例えば、ベンゾ[a]ピレンや、ジメチルベンゾ[a]アントラセン、ジエチルニトロサミン及びウレタン）に暴露されたマウスにおいて、腫瘍形成を防止することが知られていた（文献5）。しかしながら、BHAが腫瘍形成を防止する正確なメカニズムは、従来は、全く分かっていなかった。最新のデータでも、前記の防止作用が、第2相酵素群の誘導に大きく依存していることが示唆されているに過ぎなかった（文献1）。また、BHAが、第2相酵素の発現のみを誘導する単一機能誘導因子であり、第1相酵素を誘導するものではないことも知られていた（文献6）。更に、BHAが、マウスの肝臓と小腸で、GST遺伝子の発現を顕著に誘導すること（文献7～文献10）、及び2電子還元工程を触媒するNQO1の生合成を誘導することも知られていた（文献6）。しかしながら、本発明者は、後述する実施例に示すように、BHAがヘテロ2量体及び抗酸化剤反応配列（ARE）を介して、第2相酵素群遺伝子の発現に影響を与えることを、初めて実証した。

【0047】本発明による作出方法に用いることのできる非ヒト動物は、Nrf2タンパク質と小Mafタンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列（ARE）に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である非ヒト動物であれば限定されるものではない。前記非ヒト動物としては、例えば、マウスなどを用いることが好ましい。

【0048】本発明による作出方法において、Nrf2タンパク質と小Mafタンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列（ARE）に結合することによる異物代謝系第2相酵素の発現調節機構が正常である非ヒト動物に、前記ヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列（ARE）との結合に影響を与える物質を暴露する方法としては、例えば、皮膚への塗布、経口投与、吸入投与、又は注射（例えば、静脈内、皮下、又は器官内など）などの方法を挙げることができる。肝臓又は消化管への影響を観察する場合には、経口投与することが好ましい。こうして作出した非ヒト動物は、異物代謝系（特に第2相酵素発現系）が変化しているので、例えば、生体に悪影響を与える物質の作用を変化させる物質のスクリーニングに用いることができる。

【0049】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】本実施例では、nrf2遺伝子ノックアウトマウスを作出した。

(1) マウス *nrf2* ゲノム遺伝子の単離
種の異なる ECH プロブ、すなわち、プロブとして ECH-cDNA の Pst I 断片 (350 bp) を用いて、以下に示す手順に従って、マウス胎児肝臓ファージ cDNA ライブラリー (京都大学医学部所属の西川伸一博士から分与) から、完全長のマウス *nrf2*-cDNA を単離した。

【0050】すなわち、ナイロン膜に転写したファージ DNA と前記プロブとを、ハイブリダイゼーションバッファー 1 [組成: 5×SSC, 5×Denharts solution, 1% SDS, 10 mM トリス-HCl (pH 7.4), 2.5% ホルムアルデヒド、及び 0.2 mg/ml サケ精子 DNA] 中で一晩インキュベーション (42°C) した。なお、1×SSC は、0.15 M NaCl 及び 0.015 M クエン酸ナトリウム含有水溶液であり、1×Denharts solution は、0.02% フィコール、0.02% ポリビニルピロリドン、及び 0.02% ウシ血清アルブミン含有溶液である。次に、一晩インキュベートしたナイロン膜を 0.1% SDS 含有 2×SSC 溶液で 1 時間洗浄し、続いて、フィルターを X 線フィルムに感光し、シグナルを検出した。得られた cDNA の配列は、報告されているマウス *nrf2*-cDNA 配列 (文献 14) と完全に一致した。

【0051】得られたマウス *nrf2*-cDNA 全長をプロブとして用いて、以下に示す条件下で、129/SvJ マウスゲノム DNA ファージライブラリー (ストラタジーン社) をスクリーニングすることによって、完全長の *nrf2* ゲノム遺伝子と、ターゲティングベクターを作出するのに十分な長さの 5' 及び 3' フランキング配列とを含む、配列の一部が重複する 2 つのゲノムファージクローン (以下、クローン No. 7 及びクローン No. 8 と称する) を単離した。すなわち、ハイブリダイゼーションを実施するバッファーとして、ハイブリダイゼーションバッファー 2 [組成: 5×SSC, 5×Denharts solution, 1% SDS, 10 mM トリス-HCl (pH 7.4), 5.0% ホルムアルデヒド、及び 0.2 mg/ml サケ精子 DNA] を用いた。洗浄操作は、0.1% SDS 含有 0.1×SSC 溶液を用いて 65°C で 1 時間実施した。

【0052】得られた 2 つのゲノムファージクローンの内、クローン No. 7 は、2.5 kb の 5' フランキング配列と 9.5 kb の 3' フランキング配列とを含み、クローン No. 8 は、9.0 kb の 5' フランキング配列を含んでおり、クローン No. 7 の 5' 末端側の 7.5 kb の領域と、クローン No. 8 の 3' 末端側の 7.5 kb の領域とが重複していた。

【0053】(2) ターゲティングベクターの作出
前記実施例 1 (1) で得られた 2 つのゲノムファージクローンの内、ターゲティングベクターの作出に適した構

造、すなわち、相同組換えを実施するのに十分な長さのフランキング配列を有するクローン No. 7 を用いて、ターゲティングベクターを作出した。このターゲティングベクターは、SV40 核移行シグナル (Nuclear localization signal: NLS) -β-ガラクトシダーゼ (*lacZ*) リコンビナント遺伝子と、*nrf2* 遺伝子の b-Zip 領域とを置換するように設計されている。また、形質転換体を選択するために、ネオマイシン耐性 (*neo*) 遺伝子を NLS-*lacZ* 遺伝子下流に配置し、更に、非相同性組換え体に対するネガティブセレクションのために、ジフテリア毒素 (DT-A) 遺伝子を *nrf2* 遺伝子の上流に配置するように設計されている。

【0054】具体的には、前記ターゲティングベクターは、マウス *nrf2* 遺伝子の 5' 及び 3' フランキング配列である 2.5 kb 及び 9.5 kb の領域を有し、更に、ネオマイシン耐性遺伝子 (*neo*) と隣接して 5.8 kb の *lacZ*-cDNA (*nrf2* 遺伝子のエクソン 5 の一部分を含む 1.2 kb 断片と置換している) を配置するように設計されている。このターゲティングベクターは、Nrf2 タンパク質の C 末端側アミノ酸残基 280 個を欠失するように設計されており、Nrf2 タンパク質の N 末端側アミノ酸残基 301 個と、*LacZ* タンパク質との融合タンパク質として発現される。

【0055】野生型 *nrf2* 遺伝子座、ターゲティングベクター、及びターゲティングベクターを用いた相同組換えにより得られると予想される破壊された *nrf2* 遺伝子座の構造を、図 2 に模式的に示す。図 2 において、「MC1」は、単純性ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子プロモーターを意味する。また、「B」は制限酵素 BamHI の認識部位を、「H」は制限酵素 HindIII の認識部位を、「X」は制限酵素 XbaI の認識部位を、「A」は制限酵素 AccI の認識部位を、「Hp」は制限酵素 HpaI の認識部位を、それぞれ示す。「斜線入りの H」は、元々は制限酵素 HindIII の認識部位であったが、或る操作を実施することにより、もはや制限酵素 HindIII で認識されなくなった部位を示す。

【0056】(3) ターゲティングベクターの ES 細胞への導入と確認

前記実施例 1 (2) で得られたターゲティングベクター 80 µg を制限酵素 NcoI で消化してリニア化した。ES 細胞 (E14; 文献 15) 約 4×10⁷ 個を懸濁した DMEM 培地 3.2 ml に、リニア化したターゲティングベクター 80 µg を添加し、電気穿孔装置 (ジーンパルサー; パイオラッド社) を用いて、0.21 kV 及び 0.5 mF の条件で、電氣的に遺伝子を導入した。処理した前記細胞懸濁液に、0.3 mg/ml -G418 (ギブコ社) を含有する DMEM 培地 120 ml を直ちにに加え、37°C で 9 日間培養した。

【0057】G418耐性ES細胞のコロニー約1000個が得られ、その内、96個のコロニーから、常法により、高分子量DNAを調製し、以下の手順に従って実施するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によって組換え体の一次スクリーニングを実施した。前記PCR法におけるプライマーとして、ターゲティングベクターの外側のnrf2遺伝子とアニーリングすることのできるスクリーニングプライマー1（配列表の配列番号1の配列）と、lacZ遺伝子とアニーリングすることのできるスクリーニングプライマー2（配列表の配列番号2の配列）とを使用した。G418耐性ES細胞コロニーから得られた各高分子量DNAを鋳型とし、98℃で20秒間及び68℃で20分間からなるサイクルを30サイクル行なうことにより、PCR法を実施した。

【0058】前記PCR法を実施したところ、96種類のクローンの内、PCR法で陽性を示したクローン、すなわち、PCR法により何らかのDNA断片を生じたクローンは96種類であり、その中で所望の相同性組換えが起こっているクローン（3.0kbのDNA断片を生じるクローン）は、21種類（陽性クローンの22%）であった。これらについて、サザンブローディング法により更に詳細に解析したところ、21種類の前記クローンは、この遺伝子座に関してすべてヘテロであることが確認された。なお、サザンブローディング法による解析は、ゲノムDNAを制限酵素AccI及びHpaIで同時に消化した際に生じるDNA断片（野生型=4.6kb、組換え体=3.3kb）を、nrf2遺伝子のエクソン2由来のBglII/EcoRI-DNAフラグメント（150bp）（以下、プローブIIと称する）とハイブリダイズさせることにより実施した。

【0059】（4）nrf2遺伝子破壊ノックアウトマウスの作出

前記実施例1（3）で得られた21種類のクローンの内、2種類のES細胞クローン（以下、ES細胞クローンNo. 68及びES細胞クローンNo. 20と称する）を生殖細胞系キメラ作製用として使用し、以下に示す2種類の異なる方法により、キメラマウスを作出した。第1の方法、すなわち、胚盤胞マイクロインジェクション法では、C57BL/6Jマウスの3.5日目の胚盤胞に、ES細胞クローンNo. 68をマイクロインジェクトし、処理した胚盤胞をICR偽妊娠マウスに移植した。すなわち、麻酔下に、背側から子宮にアプローチし、処理した前記胚盤胞を子宮中に移植した。

【0060】第2の方法、すなわち、会合法では、C57BL/6Jマウスの2.5日目の桑実胚と、ES細胞クローンNo. 20とを会合させ、それをICR偽妊娠マウスに移植した。すなわち、麻酔下に、背側から子宮にアプローチし、処理した会合（aggregation）を子宮中に移植した。

【0061】ES細胞クローンNo. 68又はES細胞

クローンNo. 20を用いて作出された雄性キメラマウスと、雌性ICRマウス又は雌性BALB/cマウスとを交配することにより、チンチラ色を呈するF1子孫を得た。F1子孫における変異遺伝子単位の生殖系列への伝播を、尾部DNAのサザンブローディング解析により確定した。なお、サザンブローディング解析は、前記実施例1（3）に記載した方法と同様にして実施した。更に、前記F1子孫の内、nrf2遺伝子座に関してヘテロなマウス同士をかけ合わせることにより、F2子孫を作出し、サザンブローディング解析により遺伝子型を確認した。

【0062】ES細胞クローンNo. 68と雌性ICRマウスとを用いて作出したF2子孫について実施したサザンブローディング解析の結果を図3に示す。図3において、記号「+/+」は、野生型マウスを示し、記号「+/-」は、ヘテロ接合体マウスを示し、記号「-/-」は、ホモ接合体マウスを示す。また、「WT」は野生型遺伝子座由来のDNA断片を検出したバンドを示し、

「KO」は、ターゲティングベクターを用いた相同組換えにより得られると予想される破壊されたnrf2遺伝子座由来のDNA断片を検出したバンドを示す。サザンブローディング解析の結果、3.3kb断片が存在することから、F2子孫には、nrf2遺伝子座に関してヘテロなマウス（すなわち、ヘテロ接合体マウス）とホモなマウス（すなわち、ホモ接合体マウス）とが含まれ、これらのマウスでは、nrf2遺伝子の破壊が起きていることが確認された。

【0063】（5）nrf2遺伝子ノックアウトマウスのRNAブローディング解析

前記実施例1（4）で得られたヘテロ接合体マウス及びホモ接合体マウスと、野生型マウスとから、脳、肺、肝臓、脾臓、小腸、及び腎臓の各組織を取り出し、市販のmRNA精製キット【クイックブレップミクロ（Quick Prep Micro）mRNA精製キット；ファルマシアバイオテック】を用いて精製し、ポリ（A）⁺RNAを得た。各組織由来のポリ（A）⁺RNA（4μg）を、アガロースホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、ナイロン膜（バイオラッド）に転写した後、nrf2遺伝子のエクソン5由来のEcoRI/PstI-DNAフラグメント（740bp）（以下、プローブVと称する）、又は実施例1（3）に記載のプローブIIとβ-ガラクトシダーゼcDNAプローブとの組合せをプローブとして用いることによって、各組織で発現しているmRNAを検出した。なお、コントロールとして、β-アクチンcDNAプローブを用いた。

【0064】結果を図4に示す。図4において、記号「+/+」は、野生型マウスを示し、記号「+/-」は、ヘテロ接合体マウスを示し、記号「-/-」は、ホモ接合体マウスを示す。また、図4において、「肝」は肝臓を、「脾」は脾臓を、「腸」は小腸を、「腎」は腎

臓を示す。野性型 *nrf2* 遺伝子の発現を検出する目的でプローブVを利用し〔図4(A)〕、また、野性型・変異型両方の *nrf2* 遺伝子座の発現を検出する目的でプローブIIと *lacZ* プローブの混合物を利用した〔図4(B)〕。その結果、野性型遺伝子座からの発現は、ヘテロマウスにおいては野性型マウスの半分、また、ホモマウスにおいてはまったく消失していた。対照的に、野性型マウスにおいては *lacZ* 遺伝子の発現は検出されなかった。

【0065】

【実施例2】本実施例では、*nrf2* 遺伝子ノックアウトマウスにおける第2相酵素の解析を行なった。

(1) *nrf2* 遺伝子ノックアウトマウスにおけるBHA処理
前記実施例1(4)で作出した *nrf2* 遺伝子ノックアウトマウスの内、ES細胞クローンNo. 68に由来する *nrf2* 遺伝子ノックアウトマウスを、以下の操作に使用した。想定される多くの遺伝子型子孫を得るために、*nrf2* 遺伝子座におけるホモ接合ICRマウスと、ヘテロ接合ICRマウスとを交配させた。BHA処理の概略を図5に示す。前記交配により生まれたマウスの中から選んだ、生後2ヶ月の同腹雌性ヘテロ接合マウス及びホモ接合マウス組（以下、BHA未処理群1と称する）を通常飼料で飼育し、もう一方の組（以下BHA処理群1と称する）には1食餌量当たり0.7%ブチル水酸化アニソール（BHA；シグマ）を与え、それぞれ16日間飼育した。

【0066】また、同じ母親から生まれたマウスについて、16日間の代わりに18日間飼育すること以外は、前記操作を繰り返した（以下、それぞれ、BHA未処理群2及びBHA処理群2と称する）。更に、違う母親から生まれたマウスを用いて前記操作（飼育日数＝13日間又は14日間）を繰り返した（以下、飼育日数が13日間であったマウスを、それぞれ、BHA未処理群3及びBHA処理群3と称し、飼育日数が14日間であったマウスを、それぞれ、BHA未処理群4及びBHA処理群4と称する）。所定の飼育期間が経過した後、マウスを殺し、以下の操作に使用した。

【0067】(2) タンパク質染色及び免疫プロテイングによる *nrf2* ノックアウトマウスにおけるGSTの解析

前記実施例2(1)に記載のBHA処理群1及びBHA未処理群1のヘテロ接合マウス及びホモ接合マウスから摘出した肝臓及び小腸0.1gを、2%硫酸ドデシルトリウム（SDS）、10%グリセロール、2mM-EDTA、及び1mM（パラ-アミジノフェニル）メタンスルフォニルフルオリド-HClを含有する50mMトリス-HCl緩衝液（pH6.8）1ml中でホモジナイズし、すぐに5分間煮沸することによって、細胞抽出液を調製した。

【0068】細胞抽出液中のタンパク質濃度は、市販のアッセイキット〔BCAタンパク質定量試薬；ピエールセ〕を用いて決定し、この際、標準物質としてウシ血清アルブミンを使用した。各細胞抽出液（タンパク質の量として15μg）をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE；文献16）で分離し、クマシーブリリアントブルー（CBB）で染色した。なお、サイズマーカーとして、雄性マウス肝細胞質画分を使用した。

10 【0069】結果を図6に示す。図6において、記号「+/-」は、ヘテロ接合体マウスを示し、記号「-/-」は、ホモ接合体マウスを示す。また、記号「U」はBHA未処理群を示し、記号「T」はBHA処理群を示す。BHA処理したヘテロ接合体マウスでは、小腸及び肝臓で25-30kDaのタンパク質の著明な誘導が観察された。肝臓では1本、小腸では2本のバンドが誘導されたが、その誘導はたいへん強力なものであり、クマシーブリリアントブルー色素によるタンパク質染色法で確認できるほどであった。分子量とBHAによる誘導の様子から、それらのバンドはGSTのいずれかのサブユニットに対応すると考えられた。

20 【0070】ところで、雄性マウスの肝細胞質画分のGSTサブユニットの種類は、タンパク質染色法で容易に判別することができる。それと比較してみると、BHAにより肝臓で誘導されているバンドはμクラスに属するもの、小腸で誘導されているバンドはμクラス及びαクラスに属するものと結論された。一つのGSTサブユニットクラスは多くのイソフォームよりなるので、タンパク質染色法で観察できるバンドは、これら多くのイソフォームを包含していると考えられる。

30 【0071】驚いたことに、*nrf2* ノックアウトマウスにおいては、BHAによるGST誘導が全く認められなかった。この実験は繰り返し行なったが、結果の再現性は非常に高かった。更に、同腹由来でないマウスも利用して、同様の実験を2回繰り返して実施したところ、やはり同じ結果が得られた。これらのことにより、*Nrf2* タンパク質はGSTの誘導に必須の転写因子であると結論された。

40 【0072】次に、各サンプル（タンパク質の量として3μg）をSDS-PAGEで分離し、更に、電気泳動法によりPVDF膜に転写した。続いて、下記に示す適当な抗体を用いてマウスGSTサブユニットの免疫染色を行なった。マウスGSTサブユニットの内、Ya3（αクラス）、Yb（μクラス）、Yp（πクラス）については、すでに報告されている各サブユニットに特異的に反応するウサギ抗体により免疫染色した（文献17、文献20）。マウスYa1サブユニット（アルファクラス）については、McLellan及びHayesの方法に従って抗ラットYa抗体によって染色した（文献10）。

【0073】結果を図7及び表1に示す。図7及び表1において、記号「+/-」、「-/-」、「U」、及び「T」は、図6に示す記号と同じ意味である。また、表1に示す記号「*」は、以下の理由で百分率を計算しなかったことを示す。すなわち、Ya3遺伝子は肝臓で構*

遺伝子型	BHA処理	+/-		-/-		A
		U(a)	T(b)	U(c)	T(d)	B
肝臓	Ya1	1.0	2.91±0.12	1.30±0.16	1.70±0.06	65.6%
	Ya3	1.0	1.27±0.09	1.01±0.08	0.98±0.09	*
	Yp	1.0	2.55±0.16	0.99±0.06	1.26±0.08	84.5%
	Yb	1.0	1.94±0.14	0.37±0.02	1.16±0.07	16.0%
小腸	Ya1	1.0	1.66±0.14	0.85±0.06	0.95±0.04	60.6%
	Ya3	1.0	3.64±0.62	0.74±0.13	1.04±0.05	80.0%
	Yp	1.0	2.55±0.16	0.99±0.06	1.26±0.08	82.3%
	Yb	1.0	3.44±0.58	1.11±0.15	1.40±0.09	88.0%

A: nrf2ノックアウトマウスにおけるGST遺伝子誘導の減少

B: $[1 - \{(d - c) / (b - a)\}] \times 100 [\%]$

【0075】抗ラットYa抗体はマウスαクラスYa1サブユニットを特異的に認識することが知られているので、同抗体を用いて肝臓及び小腸におけるYa1の誘導を調べてみると、nrf2ホモノックアウトマウスにおいては、Ya1の発現は顕著に低下していた。デンストメーターを用いて定量化してみると、Ya1の誘導は肝臓で65.6%、小腸では60.6%も減少していた。一方、肝臓におけるYa3サブユニットの発現はNrf2にもBHAにも依存していない様子であったが、小腸においてはYa3の顕著な誘導現象がみられた。nrf2ノックアウトマウスにおいては、この誘導は約80%減少していた。

【0076】抗マウスYp抗体を用いて調べてみると、GSTπクラスに属するYpサブユニットのBHAによる誘導は、nrf2欠失マウスではみられなかった。BHAによりnrf2遺伝子を持ったマウスを誘導した際には、非誘導時に抗マウスYp抗体で同定されるバンドと移動度の違うバンドも検出されるが、これらはおそらくπクラスに属するイソ酵素であると考えられる(文献21)。しかし、πクラスに属するGSTはタンパク染色法では検出されないため、このサブユニットクラスのGST量は他のサブユニットクラスに比べると相対的に少ないと考えられる。

【0077】前述したπクラスサブユニットに比較して、μクラスサブユニットはタンパク染色法で明らかな誘導がみられる。このことと一致して、抗体染色においてもBHAによる著明な誘導とnrf2ノックアウトマウスにおけるその消失が認められた。これらの結果より、nrf2欠失はGSTの発現一般に対して重要な貢献をしていることが理解される。

【0078】(3) RNAプロテイングによるnrf2ノックアウトマウスにおけるNQO1の解析

前記実施例2(1)に記載のBHA処理群1及び2並び

* 成的に発現されていた(文献10も参照のこと)ので、BHAにより有意に誘導されなかったからである。

【0074】

【表1】

※にBHA未処理群1及び2のヘテロ接合マウス及びホモ接合マウスから肝臓及び小腸を摘出し、グアニジンチオシアネート-フェノールクロロホルム法(文献18)により各組織をホモジナイズし、RNAを抽出した。得られたRNA(10μg)を、アガロースホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、ナイロン膜(パイオラッド)に転写した後、マウスNAD(P)H:キノン酸化還元酵素(NQO1)cDNA(Koumura及びChen両博士によって供給;文献19)のPstI断片をプローブとして用いることによって、各組織で発現しているNQO1のmRNAを検出した。コントロールとして、前記実施例1(5)に記載のβ-アクチンcDNAプローブを用いた。

【0079】結果を図8に示す。図8に示す結果から明らかなように、BHAによりNQO1は肝臓及び小腸で誘導されるが、その誘導は小腸の方が顕著であった。対照として用いたβ-アクチンは小腸により強い発現が認められるが、それを考え合わせても、NQO1の発現誘導がノックアウトマウスにおいて著明に低下していることは明らかである。これらの結果から、Nrf2タンパク質により異物代謝系の第II相酵素群の誘導が統一的に制御されていることが強く示唆される。

40 【0080】

【実施例3】本実施例では、電気泳動移動度シフトアッセイによるヘテロ2量体と抗酸化剤反応配列との結合の解析を行なった。Nrf2タンパク質と小Mafタンパク質とからなるヘテロ2量体が抗酸化剤反応配列(ARE)に結合することを示すために、以下に示す手順に従って、組換えNrf2タンパク質[大腸菌マルトース結合タンパク質(MBP)とNrf2タンパク質との融合タンパク質;以下、MBP-Nrf2融合タンパク質と称することがある]及び組換えMafKタンパク質(MBPとMafKタンパク質との融合タンパク質;以下、

MBP-Ma f K融合タンパク質と称することがある)と、マウスY a 1遺伝子のプロモーター配列 (AREを含む) とを用いた、電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) を実施した。

【0081】ブルースクリプトプラスミド (pBlue script) SK (-) のSal I及びNot I切断部位の間に、実施例1 (1) で得られたマウスnrf2-cDNA (2.8 kbp) をサブクローニングした。得られたプラスミドpKI256サブクローンを、Hind III、Not I、及びT4 DNAポリメラーゼで連続的に処理した。b-ZipドメインをコードするプラスミドpKI256の1.5 kbp断片を単離し、EcoRIで切断しT4 DNAポリメラーゼで処理したプラスミドp-MAL-c2 (ニューイングランドバイオラボ) にサブクローニングした。得られたプラスミド (pMBP-Nrf2) を大腸菌SG12036株に導入し、MBP-Nrf2融合タンパク質を発現させ、以下の手順に従って、アミロースレジンアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した (文献11)。

【0082】すなわち、目的のタンパク質をコードするプラスミドを有する大腸菌SG12036株を、LB培地中で光学密度 (OD) が0.5~0.6に達するまで振盪培養し、前記OD値に達したところで、イソプロピル-1-チオール-β-D-ガラクトシド (IPTG) を最終濃度が0.3 mMになるように培地に添加し、引き続き、3時間培養した。得られた大腸菌の菌塊を溶解バッファー [組成: 10 mM-EDTA (pH 8.0), 10 mMリン酸ナトリウムバッファー, 30 mM-NaCl, 0.25% Tween 20, 及び10 mM-2-メルカプトエタノール] に懸濁し、氷上で10分間リゾチーム処理 (1 mg/ml) を実施した。更に、超音波により粉碎した後に、塩濃度を0.5 Mに調製し、菌体と上清とを遠心により分離した。得られた上清をアミロースレジンカラムに吸着させ、それを溶出することにより、目的のタンパク質を得た。なお、以上の手順は、New England Bio-Lab社の方法に準拠した。また、MBP-Ma f K融合タンパク質及びMBPは、文献23に記載したプラスミドを用いることにより調製した。

【0083】配列表の配列番号3の配列で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (マウスY a 1遺伝子のARE) を、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、[γ-³²P] 放射標識ATPで標識化することによって、AREプローブを得た。EMSAは常法に従って行った (文献11)。結果を図9 [(A) ~ (C)] に示す。

【0084】図9 (A) において、レーン1は、マウスGST-Y a 1遺伝子 (文献13) のAREプローブと、MBP (230 ng) との混合物をインキュベートし、EMSAで分析した結果を示す。同様に、レーン2

は、前記AREプローブとMBP-Nrf2融合タンパク質 (5 ng) との混合物を；レーン3は、前記AREプローブとMBP-Ma f K融合タンパク質 (10 ng) との混合物を；レーン4は、前記AREプローブとMBP-Nrf2融合タンパク質 (10 ng) とMBP-Ma f K融合タンパク質 (5 ng) との混合物を、それぞれインキュベートし、EMSAで分析した結果を示す。

【0085】図9 (A) において、レーン5は、レーン4で使用した混合物 [すなわち、前記AREプローブとMBP-Nrf2融合タンパク質 (10 ng) とMBP-Ma f K融合タンパク質 (5 ng) との混合物] を、400倍過剰の未標識プローブ (cold probe) の存在下でインキュベートし、EMSAで分析した結果を示す。同様に、レーン6は、レーン4で使用した前記混合物を、免疫していない血清の存在下で；レーン7は、レーン4で使用した前記混合物を、Nrf2タンパク質とも反応する抗ECH抗体の存在下で；レーン8は、レーン4で使用した前記混合物を、抗Ma f K抗体の存在下で、それぞれインキュベートし、EMSAで分析した結果を示す。

【0086】図9 (A) において、くさび形状の矢印で示す位置に表われるバンド (レーン7及びレーン8) が、スーパーシフトしたバンドである。なお、アスタリスク (*) で示す位置に表われるバンドは、免疫していない血清においても観察される非特異的な結合である。

【0087】図9 (A) に示す結果から明らかなように、精製タンパク質を用いてゲルシフトアッセイを行ってみると、MBP (レーン1)、MBP-Ma f K融合タンパク質 (レーン1)、及びMBP-Nrf2融合タンパク質 (レーン1) のいずれもが、単独ではDNAに結合することができなかった。それに対して、Ma f K融合タンパク質とNrf2融合タンパク質とが同時に存在すると、著明なDNA結合活性が生じた (レーン4) が、この結合活性は過剰のAREプローブにより競合される (レーン5) ので、特異的なものである。また、この結合は、抗ECH抗体 (レーン7) によっても、抗Ma f K抗体 (レーン8) によってもスーパーシフトされたが、一方、免疫していない血清によっては影響されなかった。すなわち、これらの結果は、新たに生成した複合体が、Ma f Kタンパク質とNrf2タンパク質とからなるヘテロ2量体であることを示している。

【0088】図9 (B) において、レーン1はMBP (230 ng) を；レーン2はMBP-Nrf2融合タンパク質 (5 ng) を；レーン3はMBP-Nrf2融合タンパク質 (20 ng) を；レーン4はMBP-Nrf2融合タンパク質 (40 ng) を、それぞれ、MBP-Ma f K融合タンパク質の不在下でAREプローブとインキュベートし、EMSAで分析した結果を示す。レーン6はMBP-Nrf2融合タンパク質 (5 ng)

を；レーン7はMBP-Nrf2融合タンパク質（20 ng）を；レーン8はMBP-Nrf2融合タンパク質（40 ng）を、それぞれ、MBP-MafK融合タンパク質（50 ng）の存在下でAREプローブとインキュベートし、EMSAで分析した結果を示す。レーン5は、MBP-MafK融合タンパク質とAREプローブとを；レーン9は、400倍過剰の未標識プローブの存在下で、MBP-Nrf2融合タンパク質（80 ng）及びMBP-MafK融合タンパク質（50 ng）とAREプローブとを、それぞれインキュベートし、EMSAで分析した結果を示す。

【0089】図9（B）に示す結果から明らかなように、一定量のMafKタンパク質とYal遺伝子AREプローブとが存在する状態に、精製したNrf2タンパク質を加えていくと、ヘテロ2量体に相当するバンドの強度が増加した。特に、Nrf2タンパク質を多く含むレーンにおいては、ヘテロ2量体を含むバンドよりも更に泳動度の遅いバンドが出現した。Yal遺伝子のAREは、NF-E2類似配列2個を含むので、このバンドは2つのAREサイトに同時にNrf2タンパク質とMafKタンパク質とからなるヘテロ2量体が結合していることによるものと考えられる。

【0090】他の第2相酵素群のAREに対するNrf2タンパク質とMafKタンパク質とからなるヘテロ2量体の結合を調べるために実施した、他の遺伝子におけるAREに相当するオリゴヌクレオチドを用いる競合実験の結果を図9（c）に示す。図9（C）の各レーンは、以下に示す状態で、それぞれインキュベートし、EMSAで分析した結果を示す。レーン4は、MBP-Nrf2融合タンパク質（20 ng）とMBP-MafK融合タンパク質（50 ng）とAREプローブとからなる混合物の状態にインキュベートした。レーン5は、400倍過剰のマウスGST-Yal由来の未標識オリゴヌクレオチド（プローブそれ自体）の存在下で；レーン6は、400倍過剰のマウスGST-Pi由来の未標識オリゴヌクレオチド（配列表の配列番号4の配列）の存在下で；レーン7は、400倍過剰のラットNQO1由来の未標識オリゴヌクレオチド（配列表の配列番号5の配列）の存在下で、それぞれ、レーン4で使用する混合物（AREを含む）をインキュベートした。ニワトリβ-エンハンサーのNF-E2配列（レーン8；配列表の配列番号6の配列；文献12）及びTREコンセンサス配列（レーン9；配列表の配列番号7の配列；文献22）についても、レーン5～7と同様に実施した。レーン1～3は、MBP（230 ng）；MBP-Nrf2融合タンパク質（20 ng）；MBP-MafK融合タンパク質（50 ng）の場合の結果を、それぞれ示す。

【0091】図9（C）に示す結果から明らかなように、マウスYp遺伝子及びラットNQO1遺伝子に存在する抗酸化剤反応配列（ARE）は、マウスYal遺伝

子のAREに比べると若干劣るものの、効率よく競合した。また、ニワトリβ-グロビンエンハンサーに存在するNF-E2配列は、期待した通り、非常に効率よく競合した。一方、典型的なTRE配列は、この複合体に対して競合しなかった。これらの実験の結果から、Nrf2タンパク質とMafKタンパク質とからなるヘテロ2量体がいくつかのARE配列に特異的に結合することが確認することができた。

【0092】

- 10 【発明の効果】本発明によれば、Nrf2タンパク質と小Mafタンパク質とからなるヘテロ2量体と、抗酸化剤反応配列（ARE）との結合に影響を与える物質をスクリーニングすることができる。本発明による前記スクリーニング方法により、例えば、生体に作用させるための薬剤に対する耐性を低下又は消失させ、前記薬剤の効果を持続させたり、前記薬剤を有効に作用させる薬剤を見出すことができる。また、本発明による前記スクリーニング方法により、例えば、生体防御を促し、薬物、生体異物、及び／又は毒物により生じる生体への影響又は疾患等を予防又は軽減する薬剤を見出すことができる。また、本発明によれば、生体に悪影響を与える物質、及びその物質の作用を変化させる物質をスクリーニングすることができる。更に、本発明によれば、異物代謝系が変化した非ヒト動物を作出することができる。

【0093】

【参考文献リスト】

1. Primiano, T., Sutter, T. R., and Kensler, T. W. (1997) Adv. Pharmacol. 38, 293-328
2. Chausseaud, L. F. (1979) Adv. Cancer Res. 29, 175-274.
3. 十川和博及び藤井義昭（1996）蛋白質核酸酵素，第41巻，1288-1296.
4. 相沢慎一（1995）実験医学別冊「ジーンターゲットング-ES細胞を用いた変異マウスの作製」.
5. Wattenberg, L. W. (1978) Adv. Cancer Res. 26, 197-226.
6. Buetler, T. M., Gallagher, E. P., Wang, C., Stahl, D. L., Hayes, J. D., and Eaton D. L. (1995) Toxicol. Appl. Pharmacol. 135, 45-57.
7. Hayes, J. D., Kerr, L. A., Peacock, S. D., Cronshaw, A. D., and McLellan, L. I. (1991) Biochem. J. 277, 501-512.
8. Reinhart, J., and Pearson, W. R. (1993) Arch. Biochem.

Biophys. 303, 383-393.

【0095】9. Pearson, W. R., Reinhardt, J., Sisk, S., Anderson, K., and Adler, P. N. (1988) J. Biol. Chem. 263, 13324-13332.

10. McLellan, L. I., and Hayes, D. J. (1989) Biochem. J. 263, 393-402.

11. Kataoka, K., Noda, M., and Nishizawa, M. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 700-712.

12. Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., Nishizawa, M., and Yamamoto, M. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 4184-4193.

【0096】13. Prestera, T., Holtzclaw, W., Zhang, Y., and Talalay, P. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2965-2969.

14. Chui, D. H. K., Tang W., and Orkin, S. H. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 209, 40-46.

15. Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk M. (1987) Nature 326, 292-295.

16. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685.

【0097】17. Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I., and Sato, K. (1988) *

配列

TCGAAAAGGA AAGACAAGAG CAAC

【0101】配列番号 : 2

配列の長さ : 24

配列

GCGGATTGAC CGTAATGGGA TAGG

【0102】配列番号 : 3

配列の長さ : 46

配列

TAGCTTGAA TGACATTGCT AATGGTGACA AAGCAACTTT GTCGAC

【0103】配列番号 : 4

配列の長さ : 21

配列

AACGTGTTGA GTCAGCATCC G

【0104】配列番号 : 5

配列の長さ : 30

配列

*5) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3964-3968.

18. Chomczynski, I., and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159.

19. Chen, H. H., Ma, J. H., Forrest, G. L., Deng, P. S. K., Martino, P. A., Lee, T. D., and Chen, S. (1992) Biochem. J. 284, 855-860.

20. Hatayama, I., Satoh, K., and Satoh, K. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 140, 581-588.

【0098】21. Mannervik, B., and Danielson, U. H. (1988) CRC Crit. Rev. Biochem. 23, 283-337.

22. Kataoka, K., Igarashi, K., Itoh, K., Fujiwara, K., Noda, M., Yamamoto, M., and Nishizawa, M. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 2180-2190.

23. Igarashi, K., Kataoka, K., Itoh, K., Hayashi, N., Nishizawa, M., and Yamamoto, M. (1994) Nature 367, 568-572.

【0099】

【配列表】

30 【0100】配列番号 : 1

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

※配列の型 : 核酸

※

★配列の型 : 核酸

★

☆配列の型 : 核酸

☆

◆配列の型 : 核酸

◆

27

AGTCTAGAGT CACAGTGA CT TGGCAAAATC

【0105】配列番号 : 6

配列の長さ : 31

配列

TCGCCCGAAA GGAGCTGA CT CATGCTAGCC C

【0106】配列番号 : 7

配列の長さ : 26

配列

TCGAGCTCGG CAATGACTCA TTGCTC

【図面の簡単な説明】

【図1】異物代謝系を模式的に示す説明図である。

【図2】nrf2ノックアウトマウス作出のストラテジーを模式的に示す説明図である。

【図3】サザンブローディング法による電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図4】ノザンブローディング法による電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図5】BHAによる第2相酵素誘導の解析の操作を模

* 配列の型 : 核酸

※ 配列の型 : 核酸

★式的に示す説明図である。

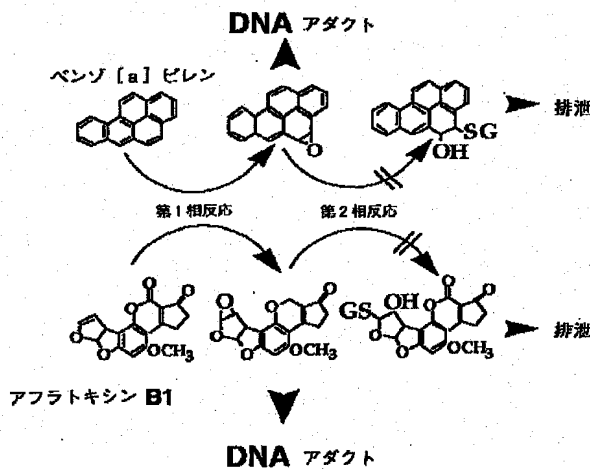
【図6】SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図7】ウエスタンブローディング法による電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

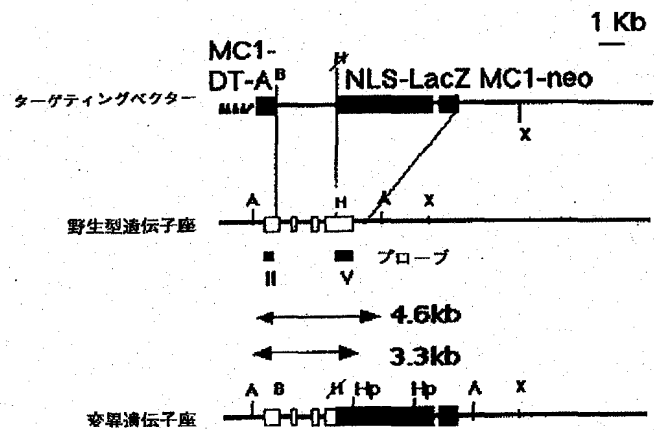
【図8】ノザンブローディング法による電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図9】電気泳動移動度シフトアッセイによる電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

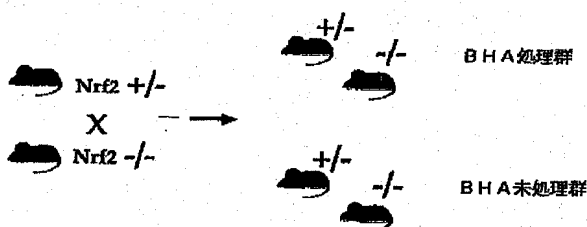
【図1】



【図2】

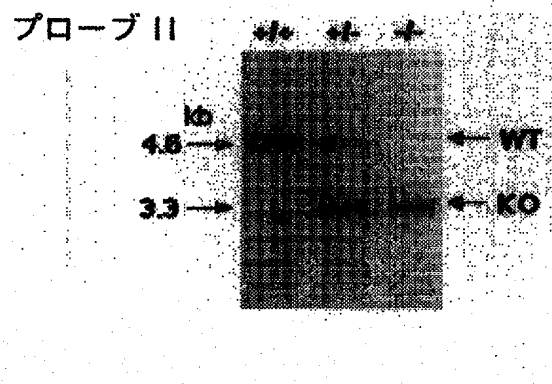


【図5】

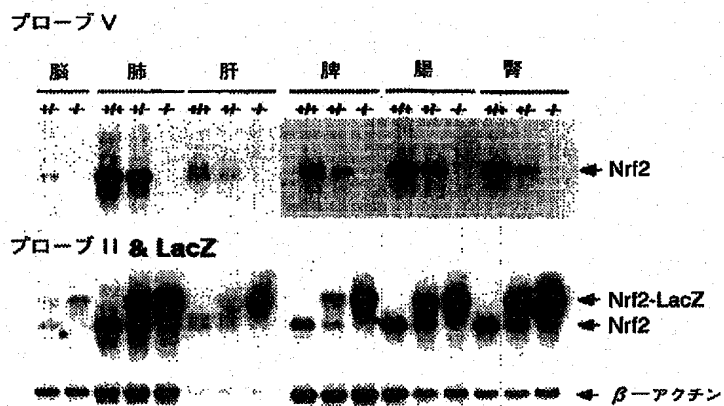


【図 3】

図面代用写真

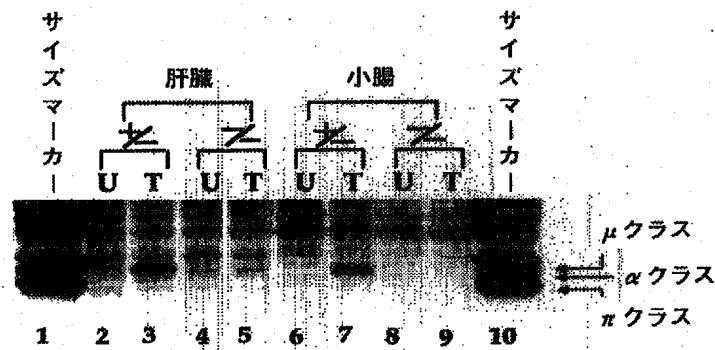


【図 4】



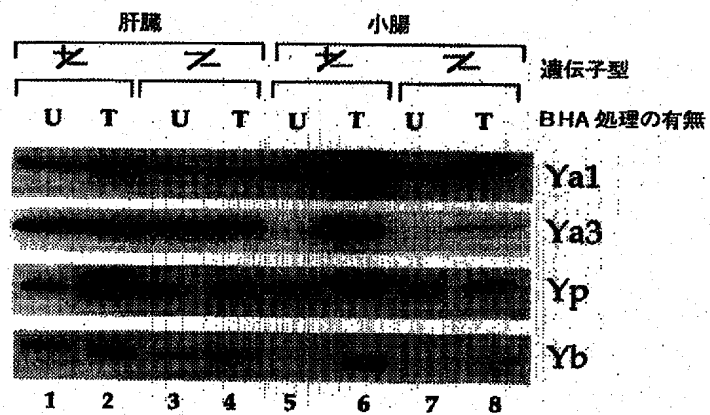
図面代用写真

【図6】



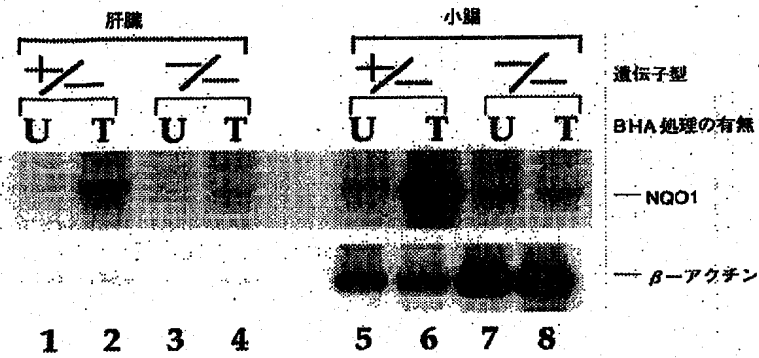
図面代用写真

【図7】



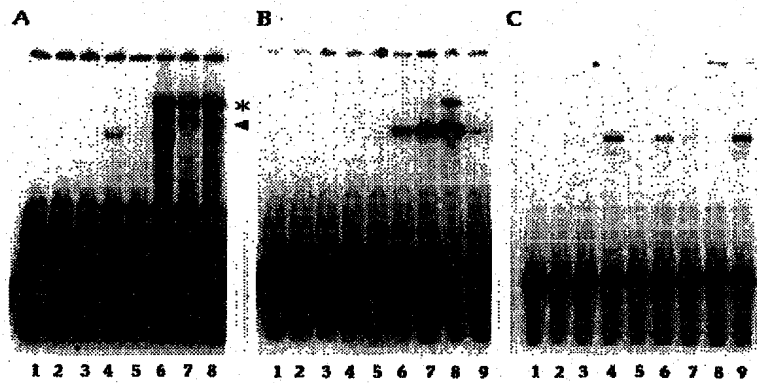
図面代用写真

【図 8】



図面代用写真

【図 9】



図面代用写真

フロントページの続き

(72) 発明者 鍋島 陽一
東京都小平市小川東 4-1-1 国立精神
神経センター神経研究所内

(72) 発明者 伊東 健
茨城県つくば市天王台 1-1-1 筑波大
学基礎医学系分子発生生物学教室内